

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : <b>C12N 15/86, C07K 14 /82, 14 /47</b>	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/03028</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>20. Januar 2000 (20.01.00)</b>
--	----	---

(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE99/02181</b>	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>12. Juli 1999 (12.07.99)</b>	
(30) Prioritätsdaten: <b>198 30 907.4 10. Juli 1998 (10.07.98) DE</b>	
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): <b>MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</b>	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: <b>DÖRKEN, Bernd [DE/DE]; Lyckallee 47, D-14055 Berlin (DE).</b>	Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(72) Erfinder; und	
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): <b>WOLFF, Gerhard [DE/DE]; Gethsemanestrasse 5, D-10437 Berlin (DE). SCHUMACHER, Axel [DE/DE]; Charlottenstrasse 38, D-13156 Berlin (DE).</b>	
(74) Anwalt: <b>BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</b>	

(54) Title: METHOD FOR OPTIMIZING THE PRODUCTION OF ADENOVIRUS VECTORS

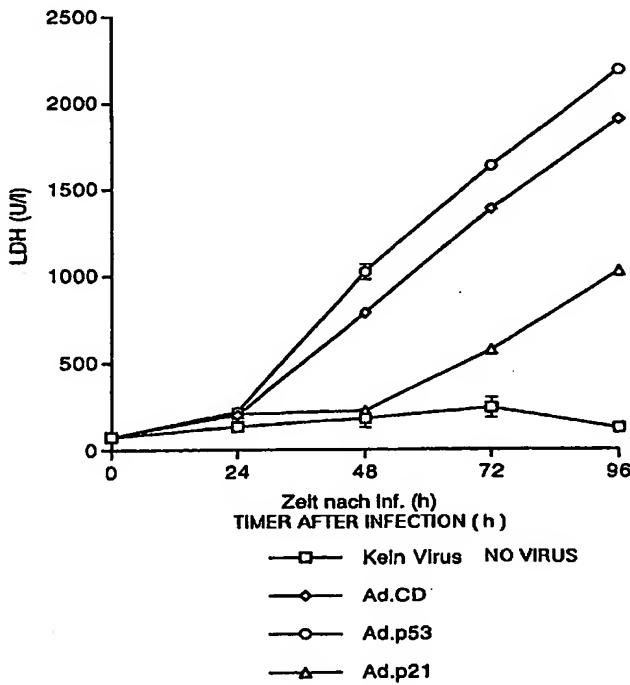
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR OPTIMIERUNG DER PRODUKTION VON ADENOVIRUS-VEKTOREN

## (57) Abstract

The invention relates to a method for improving the production of adenovirus vectors, characterized in that the cDNA of the cell cycle regulator p21 is overexpressed in a corresponding production line.

## (57) Zusammenfassung

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Verbesserung der Produktion von Adenovirus-Vektoren ist dadurch gekennzeichnet, daß die cDNA des Zellzyklusregulators p21 in einer entsprechenden Produktionslinie überexprimiert wird.



**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Verfahren zur Optimierung der Produktion von Adenovirus-Vektoren**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der Produktion von Adenovirus-Vektoren durch Überexpression des Zellzyklusregulators p21, einem Hemmer von Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK), in entsprechenden Produktionszelllinien.

Bekanntermaßen sollen z.B. zur Behandlung genetischer Erkrankungen über gentherapeutische Methoden die bei der Krankheit defekten Gene durch intakte Gene ersetzt werden. Die intakten Gene werden in das Gewebe transferiert, in dem das entsprechende Gen normalerweise exprimiert wird. Für eine wirksame Therapie muß der Gentransfer einen hohen Anteil der Zellen des Zielgewebes erreichen. Hinsichtlich ihrer Effektivität sind virale Vektoren bis heute nichtviralen Gentransfersystemen überlegen. Die am häufigsten angewandten viralen Vektoren sind aufgrund ihrer großen Effektivität Adenovirus-Vektoren.

Die Effizienz und Qualität der Amplifikation von Ad-Vektoren in entsprechenden Produktionszelllinien hängt in entscheidendem Maße davon ab, ob die den Vektor amplifizierenden Zelllinien zum richtigen Zeitpunkt geerntet werden. Wird zu früh geerntet, ist zu wenig Ad vektor produziert worden, wird zu spät geerntet, sind die Zellen schon abgestorben und der Ad vektor unwiederbringbar verloren. Letzteres wird dadurch verschärft, daß während der Ad-Vektor Produktion ein gesteigerter Medienverbrauch stattfindet, dadurch das Medium stärker angesäuert wird und durch seinen sinkenden pH-Wert die Ad-Vektor produzierenden Zellen und somit der zu produzierende Ad-Vektor weiter geschädigt werden.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren

zu entwickeln, das diesen Mechanismus aufhält und es erlaubt, die Ad-Vektor produzierenden Zellen am Leben zu halten.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß unabhängig vom endogenen Status des Zellzyklusregulators p21 sein genetisches Material, wie das Gen oder eine cDNA von p21 in eine Produktionszelllinie zur Vermehrung von Adenovirus Vektoren (Ad-Vektor) eingebracht wird. Durch die Überexpression von p21 wird die Produktionszelllinie gehindert, nach Infektion mit dem zu amplifizierenden Ad-Vektor in Apoptose zu gehen und die Mediumssituation verbessert.

Unter Verwendung an sich bekannter Gentransfertechniken wird eine cDNA des Zellzyklusregulators p21 in einer Produktionszelllinie zur Vermehrung von Adenovirus Vektoren (Ad-Vektor) eingebracht. Dies geschieht üblicherweise in Form einer Expressionskassette mit oder ohne einem regulierbaren Promotor.

p21 ist ein bekannter Zellzyklusregulator, der als Hemmer von Zyklin-abhängigen Kinasen den Wiedereintritt senescenter Zellen in den Zellzyklus verhindert. Diese Funktion des p21 schließt verschiedene Mechanismen ein, wie Hypophosphorylierung des Retinoblastom Genproduktes (Rb), Bindung an 'proliferating cell nuclear antigen' (PCNA), Bindung an CDK-Zyklin-Komplexen wie Zyklin D-CDK4, Zyklin E-CDK2 und Zyklin A-CDK2. Während die Wechselwirkung von p21 mit PCNA die DNA-Replikation blockiert, verhindert die Wechselwirkung mit CDK-Zyklin-Komplexen den Zellzyklusbeginn durch G1 Arrest. Die Gegenwart von p21 und seiner zellulären Funktion ist von Lebenswichtigkeit für das Überleben der Zelle. Das zeigt sich darin, daß kaum Mutationen des Proteins existieren, die lebensfähig sind.

Bekanntermaßen replizieren Eukaryonten-Zellen ihr Genom nur während eines umschriebenen Zeitabschnittes, der als DNA-

Synthesephase oder kurz als S-Phase bezeichnet wird. Die Phasen des Zellzyklus umfassen vier Phasen: G1-Phase, S-Phase, G2-Phase und Mitose. Ihre Zeiten sind relativ konstant: Die G1-Phase ist von unterschiedlicher Länge: in proliferierenden Zellen liegt sie zwischen 2 und 20 Stunden, S-Phase: 6-10 Stunden, G2-Phase: 2-4 Stunden, Mitose: 3-4 Stunden.

Für den stabilen Gentransfer von p21 in an sich bekannte Produktionszelllinien werden die an sich üblichen Übertragungsmethoden eingesetzt, wobei entweder die reine DNA übertragen wird oder sie in entsprechende Vektoren verpackt wird, die viral oder nichtviral sein können.

Gemäß der Erfindung besteht eine Ausführungsvariante darin, das genetische Material von p21 stabil unter Nutzung eines konstitutiv exprimierenden Promoters oder unter Nutzung eines regulierbaren Promoters zu übertragen.

Eine weitere Ausführungsvariante besteht darin, das genetische Material von p21 transient unter Nutzung eines konstitutiv exprimierenden Promoters oder unter Nutzung eines regulierbaren Promoters zu übertragen.

Gemäß der Erfindung wird unter einer stabilen Übertragung die Integration des genetischen Materials von p21 in das Genom der Zielzelle verstanden. Bei transienter Übertragung liegt das genetische Material von p21 epichromosomal vor.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat den Vorteil, daß die Expression von genetischem Material des p21 in der Zelllinie diese länger am Leben erhält, wodurch die Ernte des Ad vektors zum optimalen Zeitpunktes möglich ist.

Die Erfindung wird am Beispiel der Amplifikation von verschiedenen Adenovirus-Vektoren in Adenovirus-Produktionszelllinien erläutert.

Adenovirus-Vektoren werden in sogenannten Produktionszelllinien vermehrt. Unabhängig von der zu benutzenden Zellart und der prinzipiellen Methode kommt es in den Produktionszellen schon während der Vermehrung der Adenovirus-Vektoren zur Expression des Transgens für das diese Vektoren kodieren. Wird ein toxisches, z.B. ein Apoptose-förderndes, Gen exprimiert, stirbt die Zelle früher, wird ein Apoptose-hemmendes Gen exprimiert, leben die Zellen länger. Während ersteres die Vektorproduktion beeinträchtigt, beeinflusst letzteres die Vektorproduktion positiv. Konsequenterweise geht eine Produktionszelllinie die einen Adenovirus-Vektor vermehrt, der das Apoptose-fördernde Gen p53 (Ad.p53) trägt, viel früher in Apoptose als wenn sie einen Adenovirus-Vektor amplifiziert, der ein Apoptose-hemmendes Gen trägt, wie z.B. p21 (Ad.p21) (Abb.1). Das zeigt sich sowohl in der Zahl der toten Zellen als auch in den metabolischen Bedingungen der Zellkultur. Letztere sind wiederum wichtig für die Qualität der Ausbeute. Folglich zeigt eine mit Ad.p21 infizierte Produktionszelllinie deutlich bessere Mediumverhältnisse als eine mit Ad.p53 infizierte Kultur (Abb. 2 bis Abb. 4).

Abb. 1 Morphologie von Zellkulturen der Adenovirus-Vektor Produktionszelllinie 293, die mit verschiedenen Ad-Vektoren infiziert wurden. A: Pseudo-Infektion, B: Ad.CD (Cytosin-Deaminase), C: Ad.p21, D: Ad.p53.

Abb. 2 Mediumverbrauch am Beispiel der Glukosekonzentration in Zellkulturen der Adenovirus-Vektor Produktionszelllinie 293, die mit den verschiedenen Ad-Vektoren (s. Abb.1) infiziert wurde.

Abb. 3 Zellschädigung am Beispiel der Lactatdehydrogenase(LDH)-Konzentration im Medium der Zellkulturen der Adenovirus-Vektor Produktionszelllinie 293, die mit den verschiedenen Ad-Vektoren (s. Abb. 1) infiziert wurde.

Abb. 4 Laktatkonzentration im Medium der Zellkulturen der Adenovirus-Vektor Produktionszelllinie 293, die mit den verschiedenen Ad-Vektoren infiziert wurde.

**Patentansprüche**

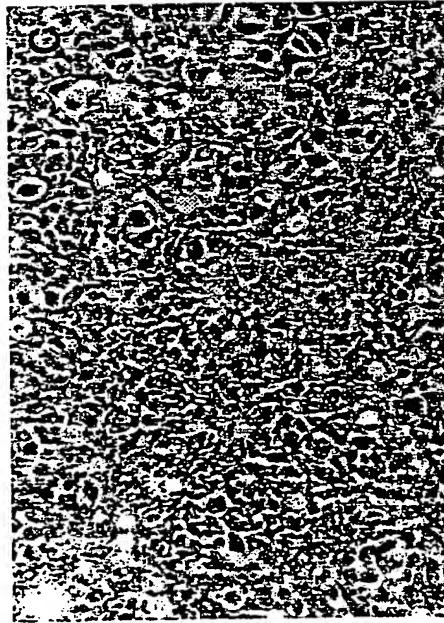
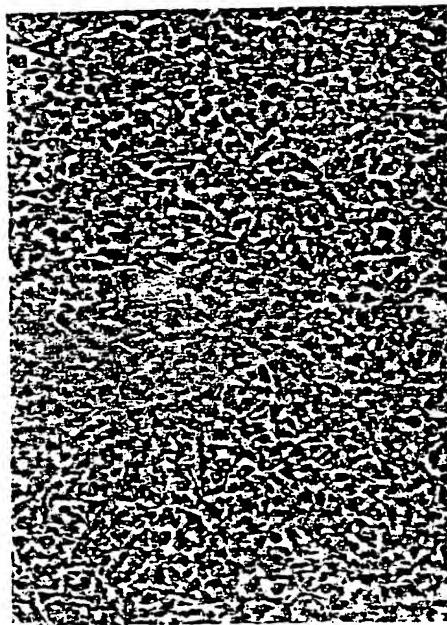
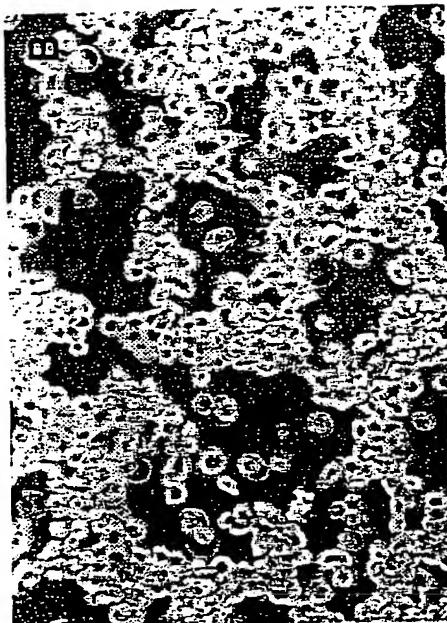
1. Verfahren zur Optimierung der Produktion von Adenovirus-Vektoren, gekennzeichnet dadurch, daß unabhängig vom endogenen Status des Zellzyklusregulators p21 genetisches Material von p21 in die Adenovirus-Produktionszelllinie eingebracht und dort exprimiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine stabile Übertragung unter Nutzung eines konstitutiv exprimierenden Promotors erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine stabile Übertragung unter Nutzung eines regulierbaren Promotors erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine transiente Übertragung unter Nutzung eines konstitutiv aktiven Promotors erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine transiente Übertragung unter Nutzung eines regulierbaren Promotors erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Gentransfer von genetischem Material des p21 mittels an sich bekannter Gentechniken durch Übertragung der reinen DNA oder unter Verwendung viraler oder nichtviral er Vektoren

erfolgt.

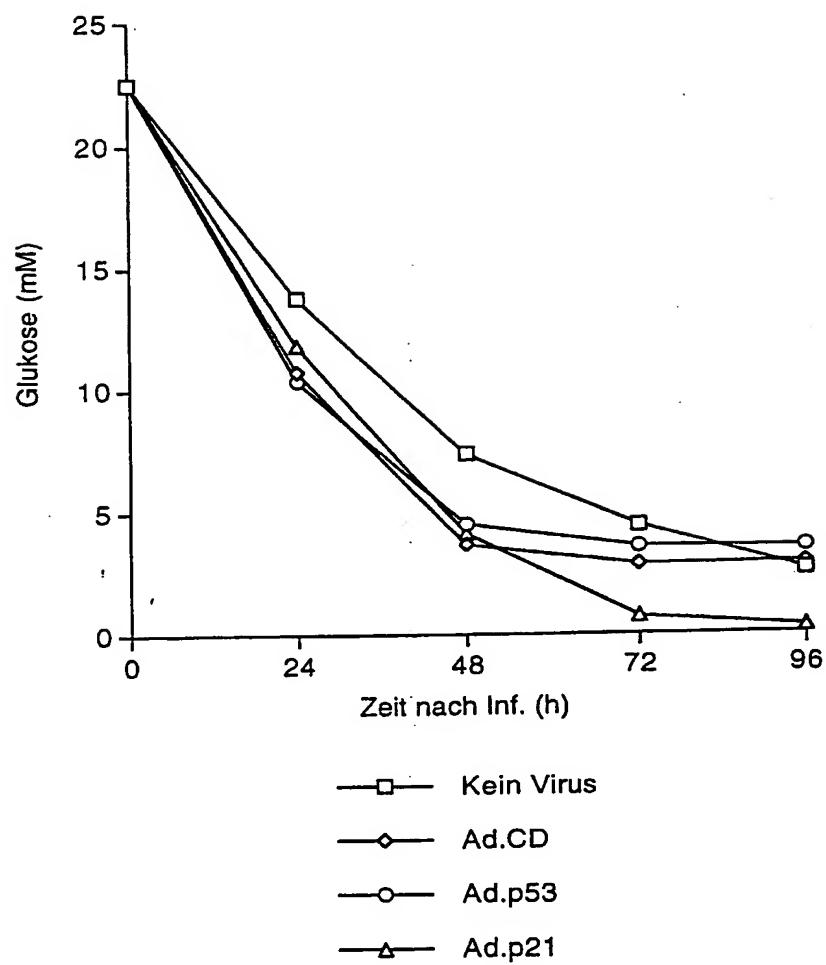
7. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
das Verfahren unabhängig von der benutzten Produktionszelllinie  
ist.

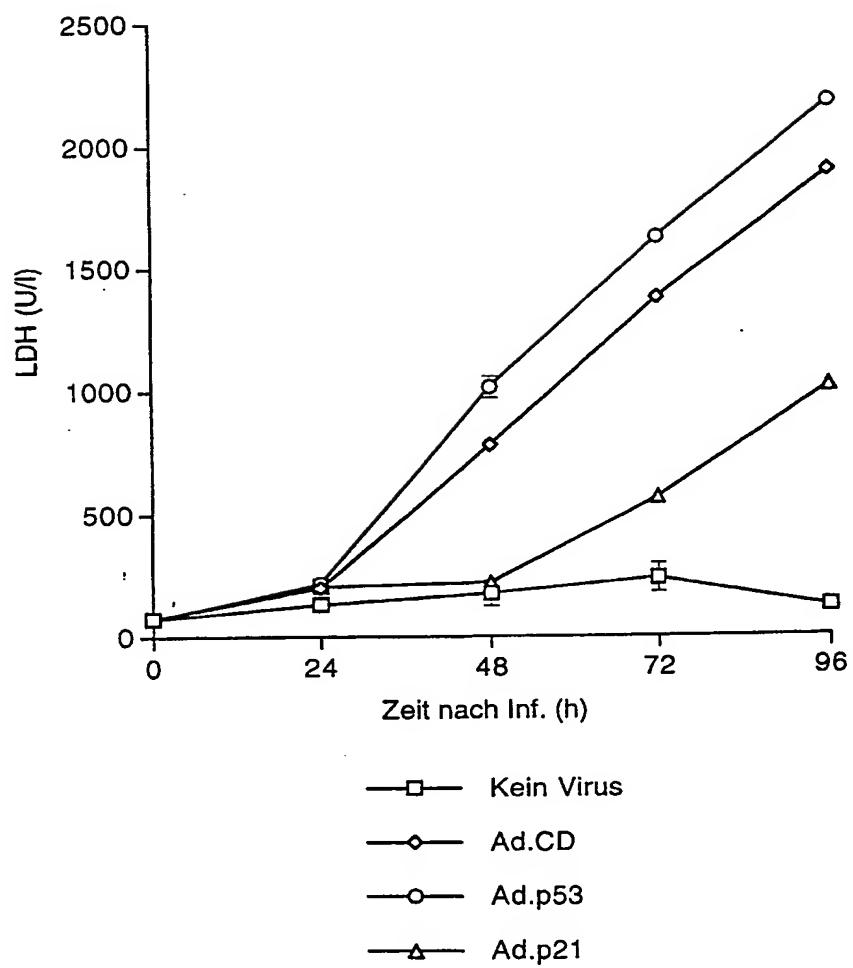
8. Verwendung von genetischem Material des Zellzyklusregulators  
p21 in Produktionszelllinien zur Herstellung adenoviraler  
Vektorsysteme.

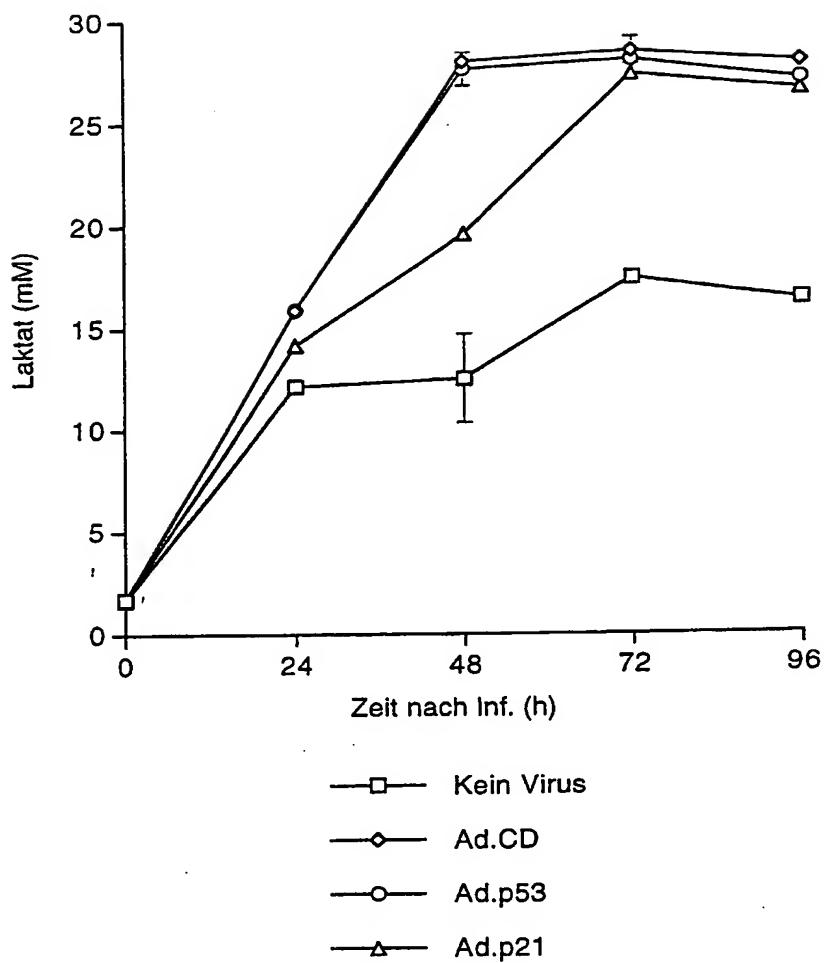
Abb. 1



BEST AVAILABLE COPY







PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 7 : <b>C12N 15/86, C07K 14 /82, 14 /47</b>	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/03028</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>20. Januar 2000 (20.01.00)</b>																														
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE99/02181</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).																														
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>12. Juli 1999 (12.07.99)</b>																																
(30) Prioritätsdaten: <b>198 30 907.4 10. Juli 1998 (10.07.98) DE</b>																																
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): <b>MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</b>																																
(71)(72) Anmelder und Erfinder: <b>DÖRKEN, Bernd [DE/DE]; Lyckallee 47, D-14055 Berlin (DE).</b>		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>																														
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): <b>WOLFF, Gerhard [DE/DE]; Gethsemanestrasse 5, D-10437 Berlin (DE). SCHUMACHER, Axel [DE/DE]; Charlottenstrasse 38, D-13156 Berlin (DE).</b>		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: <b>13. April 2000 (13.04.00)</b>																														
(74) Anwalt: <b>BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</b>																																
<b>(54) Title: METHOD FOR OPTIMIZING THE PRODUCTION OF ADENOVIRUS VECTORS</b>																																
<b>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR OPTIMIERUNG DER PRODUKTION VON ADENOVIRUS-VEKTOREN</b>																																
<b>(57) Abstract</b>																																
The invention relates to a method for improving the production of adenovirus vectors, characterized in that the cDNA of the cell cycle regulator p21 is overexpressed in a corresponding production line.																																
<b>(57) Zusammenfassung</b>																																
Das erfindungsgemäße Verfahren zur Verbesserung der Produktion von Adenovirus-Vektoren ist dadurch gekennzeichnet, daß die cDNA des Zellzyklusregulators p21 in einer entsprechenden Produktionslinie überexprimiert wird.																																
<table border="1"><caption>Data extracted from the LDH assay graph</caption><thead><tr><th>Zeit nach Inf. (h) / TIMER AFTER INFECTION (h)</th><th>LDH (U/l) - Kein Virus / NO VIRUS</th><th>LDH (U/l) - Ad.CD</th><th>LDH (U/l) - Ad.p53</th><th>LDH (U/l) - Ad.p21</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>24</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td></tr><tr><td>48</td><td>100</td><td>200</td><td>100</td><td>1000</td></tr><tr><td>72</td><td>100</td><td>200</td><td>200</td><td>1400</td></tr><tr><td>96</td><td>100</td><td>200</td><td>200</td><td>2200</td></tr></tbody></table>			Zeit nach Inf. (h) / TIMER AFTER INFECTION (h)	LDH (U/l) - Kein Virus / NO VIRUS	LDH (U/l) - Ad.CD	LDH (U/l) - Ad.p53	LDH (U/l) - Ad.p21	0	0	0	0	0	24	100	100	100	100	48	100	200	100	1000	72	100	200	200	1400	96	100	200	200	2200
Zeit nach Inf. (h) / TIMER AFTER INFECTION (h)	LDH (U/l) - Kein Virus / NO VIRUS	LDH (U/l) - Ad.CD	LDH (U/l) - Ad.p53	LDH (U/l) - Ad.p21																												
0	0	0	0	0																												
24	100	100	100	100																												
48	100	200	100	1000																												
72	100	200	200	1400																												
96	100	200	200	2200																												

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Ostereich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. national Application No  
PCT/DE 99/02181

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/86 C07K14/82 C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KATAYOSE, D. ET AL.: "Consequences of p53 gene expression by adenovirus vector on cell cycle arrest and apoptosis in human aortic vascular smooth muscle cells" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 215, no. 2, 13 October 1995 (1995-10-13), pages 446-451, XP002012685 ORLANDO, FL US the whole document —	1
A	WO 96 25507 A (COWAN KENNETH ;SETH PREM K (US); US HEALTH (US)) 22 August 1996 (1996-08-22) the whole document —	1 —/—

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 February 2000

Date of mailing of the international search report

10/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No PCT/DE 99/02181
---

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EASTHAM J A ET AL: "IN VIVO GENE THERAPY WITH P53 OR P21 ADENOVIRUS FOR PROSTATE CANCER" CANCER RESEARCH, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, vol. 55, no. 22, page 5151-5155 XP000606345 ISSN: 0008-5472 the whole document	1
A	STACEY, D. W. & KUNG H-F.: "Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein" NATURE., vol. 310, 9 August 1984 (1984-08-09), pages 508-511, XP000867113 MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON., GB ISSN: 0028-0836 the whole document	1
P,A	WOLF, J.K. ET AL.: "Overexpression of p21 via an adenovirus vector induces growth arrest and apoptosis in human ovarian cancer cell lines" GYNECOLOGIC ONCOLOGY, vol. 72, no. 3, March 1999 (1999-03), page 472 XP000866139 abstract	1
A,P	MAZUR X, FUSSENEGGER M, RENNER WA, BAILEY JE. : "Higher productivity of growth-arrested Chinese hamster ovary cells expressing the cyclin-dependent kinase inhibitor p27." BIOTECHNOL PROG., vol. 14, no. 5, September 1998 (1998-09), pages 705-713, XP000869569 the whole document	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/DE 99/02181

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9625507 A	22-08-1996	AU 5297496 A	04-09-1996

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Int. nationales Aktenzeichen PCT/DE 99/02181
---

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/86 C07K14/82 C07K14/47
---

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK
---

<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>
---------------------------------

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C07K
---

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen
---

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
---

<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>
--

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KATAYOSE, D. ET AL.: "Consequences of p53 gene expression by adenovirus vector on cell cycle arrest and apoptosis in human aortic vascular smooth muscle cells" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 215, Nr. 2, 13. Oktober 1995 (1995-10-13), Seiten 446-451, XP002012685 ORLANDO, FL US das ganze Dokument	1
A	WO 96 25507 A (COWAN KENNETH ;SETH PREM K (US); US HEALTH (US)) 22. August 1996 (1996-08-22) das ganze Dokument	1

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

3. Februar 2000

10/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Chambonnet, F

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Int. nationales Aktenzeichen PCT/DE 99/02181
---

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EASTHAM J A ET AL: "IN VIVO GENE THERAPY WITH P53 OR P21 ADENOVIRUS FOR PROSTATE CANCER" CANCER RESEARCH, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, Bd. 55, Nr. 22, Seite 5151-5155 XP000606345 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument ---	1
A	STACEY, D. W. & KUNG H-F.: "Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein" NATURE., Bd. 310, 9. August 1984 (1984-08-09), Seiten 508-511, XP000867113 MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON., GB ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument ---	1
P,A	WOLF, J.K. ET AL.: "Overexpression of p21 via an adenovirus vector induces growth arrest and apoptosis in human ovarian cancer cell lines" GYNECOLOGIC ONCOLOGY, Bd. 72, Nr. 3, März 1999 (1999-03), Seite 472 XP000866139 Zusammenfassung ---	1
A,P	MAZUR X, FÜSSENEGGER M, RENNER WA, BAILEY JE. : "Higher productivity of growth-arrested Chinese hamster ovary cells expressing the cyclin-dependent kinase inhibitor p27." BIOTECHNOL PROG., Bd. 14, Nr. 5, September 1998 (1998-09), Seiten 705-713, XP000869569 das ganze Dokument ---	1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02181

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9625507 A	22-08-1996	AU 5297496 A	04-09-1996